

毛细管电泳法测定增味剂中的 5'-肌苷酸二钠和5'-鸟苷酸二钠的含量

杜建中¹, 曾秀文¹, 黄少春¹, 丁 玢^{2,3}

(1. 湛江师范学院广东高校新材料工程技术开发中心, 广东湛江 524048;

2. 圣地亚哥州立大学公共卫生学院, 美国圣地亚哥 92123;

3. 加州大学圣地亚哥分校预防医学系, 美国圣地亚哥 92037)

摘要:建立了同时测定 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的毛细管电泳法, 研究了缓冲溶液种类、浓度、pH、电压等对测定的影响, 对测定条件进行了优化。在波长 250nm, 分离电压 15kV, $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸-5% 乙醇缓冲溶液 (pH=10.3) 中, 增味剂中的 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠在 5min 内得到了较好的分离, 浓度与峰面积之间具有良好的线性关系。

关键词:毛细管电泳, 5'-肌苷酸二钠, 5'-鸟苷酸二钠

Study on the determination of disodium 5'-inosinate, disodium 5'-guanylate by capillary electrophoresis

DU Jian-zhong¹, ZENG Xiu-wen¹, HUANG Shao-chun¹, DING Ding^{2,3}

(1. Development Center for Newmaterials Engineering and Technology in Universities of Guangdong,

Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China;

2. Graduate School of Public Health, San Diego State University, San Diego 92123, USA;

3. Department of Family and Preventivemedicine, University of California, San Diego 92037, USA)

Abstract: This study established the method for directly determination and simultaneous separation of disodium 5'-inosinate, disodium 5'-guanylate using capillary electrophoresis. It also examined the effects of factors such as voltage, the type, concentration and acidity of the running buffer on determination. The best separation was achieved in the running buffer of $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 - $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3BO_3 (with 5% percent alcohol) at pH = 10.3, and 15kV separation voltage, and with UV detection at 250nm. Disodium 5'-inosinate and disodium 5'-guanylate were completely separated and detected using the method within 5min. The concentration and peak area of disodium 5'-inosinate and disodium 5'-guanylate showed good linear relationships.

Key words: capillary electrophoresis; disodium 5'-inosinate; disodium 5'-guanylate

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)12-0335-03

呈味核苷酸主要包括 5'-肌苷酸二钠 (IMP) 和 5'-鸟苷酸二钠 (GMP), 与谷氨酸钠混合时产生协同效应, 使鲜度提高数倍至数十倍; 同时核苷酸对甜味和肉味有增效作用, 对咸、酸、苦味及腥、焦味有抑制作用, 在食品工业生产中越来越受到重视和欢迎^[1]。目前用于检测 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的方法有双波长法^[2]、双波长比值光谱法^[3]、高效液相色谱法^[4]、离子色谱法^[5]等。高效毛细管电泳是基于被分离物质的净电荷与质量比的差异, 各组分按其表面电荷的差异, 以不同的速率在毛细管内运行缓冲溶液中地移动而导

致分离^[6]的一种新型分析方法。本文详细研究了 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的毛细管电泳分离条件, 并用于部分市售鲜味剂中 5'-肌苷酸二钠、5'-鸟苷酸二钠的测定, 取得了较好的效果。方法具有高效、快速、试样用量少、分离效果高等特点。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

5'-肌苷酸二钠 德国; 5'-鸟苷酸二钠 日本; 磷酸二氢钠 天津市科密欧化学试剂开发中心; 硼酸、盐酸 汕头市光华化学厂; 氢氧化钠 天津市化学试剂三厂; 十二烷基硫酸钠 SDS, 天津市服晨化学试剂厂; 所有实验用水 均为去离子水; 试剂 均为分析纯; 微孔醋酸纤维滤膜 $\Phi = 0.45\mu\text{m}$, 上海医药工业研究所亚东分离器材厂。

GL2001 高效毛细管电泳仪 北京采陆科学仪

收稿日期: 2009-12-10

作者简介: 杜建中 (1956-), 男, 教授, 主要从事分析化学教学及微量组分分析的研究。

基金项目: 湛江师范学院科学研究基金资助项目 (L0514)。

器有限公司;未涂层熔融石英毛细管 内径 $75\mu\text{m}$,有效长度 47cm ,河北永年光纤纤维厂;PHS-3C 型精密酸度计 上海雷磁仪器厂;离心机 金坛市新航玻璃仪器厂;UV-2550 型紫外可见分光光度计 日本岛津制作所。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 标准贮备液:准确称取 5'-肌苷酸二钠标准品 0.1140g ,5'-鸟苷酸二钠标准品 0.1143g ,分别用水溶解并定容至 50.00mL ,于暗处保存。

1.2.2 样品的预处理 准确称取待测样品 2.00g ,加适量水溶解并定容至 10.00mL ,摇匀,用离心机进行离心分离,取其上清液,用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤,收集滤液待用。

1.2.3 电泳条件 检测波长 250nm ,采用阳极端手动压差进样,进样高度 10cm ,进样时间 3s ,分离电压 15kV ,运行缓冲溶液: $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3 - 5\%$ 乙醇溶液 ($\text{pH} = 10.3$)。

毛细管在每次运行前分别用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ 、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 、水和缓冲溶液冲洗 3min ,每次进样前用水、缓冲溶液分别冲洗 2min 。

1.2.4 测定方法 将 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的标准溶液以 1:1 混合,并逐级稀释,配制一系列的标准溶液,在电泳条件下测定 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的峰面积,以峰面积(A)对浓度(C)作图,得到其标准曲线,计算回归方程。测定已过滤的样品溶液中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的峰面积,将峰面积代入回归方程,求出样品中 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的含量。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

2.1.1 检测波长的选择 利用 UV-2550 型紫外可见分光光度计,测定了 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠在 $200\sim 400\text{nm}$ 处的吸收曲线,见图 1。5'-肌苷酸二钠、5'-鸟苷二钠的最大吸收波长分别为 248 、 262nm ,本实验选用 250nm 作为检测波长。

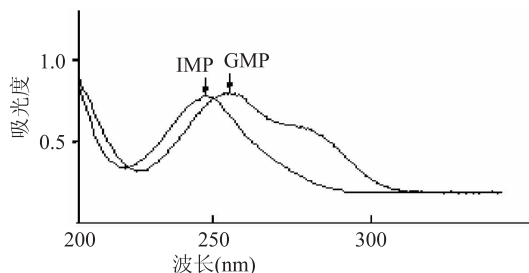


图 1 吸收曲线图

2.1.2 缓冲体系的选择 缓冲体系直接影响离子的迁移和分离。实验考察了分离电压为 20kV , $\text{pH} = 9.5$ 时,5'-肌苷酸二钠、5'-鸟苷酸二钠标准混合样在硼酸缓冲系、磷酸缓冲系、磷酸二氢钠-硼酸缓冲系、磷酸二氢钠-硼酸-SDS 缓冲系中的分离情况。结果显示,在磷酸二氢钠-硼酸缓冲系中分离效果相对理想,进一步考察了磷酸二氢钠与硼酸浓度比为 1:1、1:2、1:4、1:6、2:1 时的电泳情况,结果显示 1:1 时的分离效果较好,固定磷酸二氢钠与硼酸浓度比为 1:1。继续考察了标准混合样在 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢

钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲溶液、 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲溶液中的分离效果,见图 2。由图 2 可知, $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲体系分离效果好,故选此体系为运行缓冲溶液。

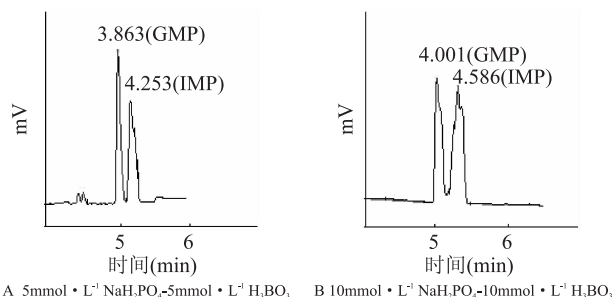


图 2 缓冲体系浓度的影响

注: $\text{pH} = 9.5$,分离电压为 20kV 。

2.1.3 pH 的影响 分离电压为 20kV ,采用 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸为缓冲溶液,考察了 5'-肌苷酸二钠、5'-鸟苷酸二钠标准混合样在 pH 为 9.5、10.0、10.3、10.5 条件下的分离情况,见图 3。由图 3 可知,分离的最佳 pH 为 10.3。

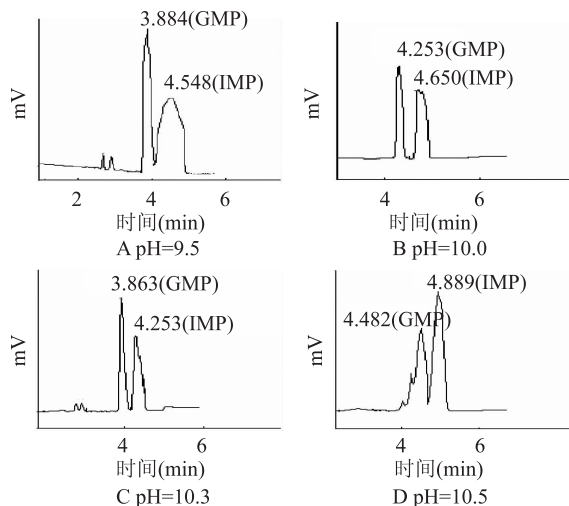


图 3 pH 的影响

注:运行缓冲液: $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 - 5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$,分离电压为 20kV 。

2.1.4 电压的选择 在 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲溶液中,考察了电压对样品分离效果的影响,见图 4。由图 4 可知,电压为 15kV 时 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠得到了较好的基线分离。

2.1.5 乙醇浓度对测定的影响 采用 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠- $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸为缓冲溶液, $\text{pH} 10.3$ 时,固定电压为 15kV ,测定了 IMP、GMP 标准混合样在含有 5%、10%、15% 乙醇溶液中的迁移时间。当乙醇浓度为 5% 时,可使 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准混合样得到基线分离。

2.2 定性分析

在电泳条件下对待测鸡精溶液进行分离,5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠能够得到较好的分离。采用标准加入法,确定了待测组分的峰,电泳图见图 5。结果显示,前锋为 5'-鸟苷酸二钠,后峰为 5'-肌苷酸

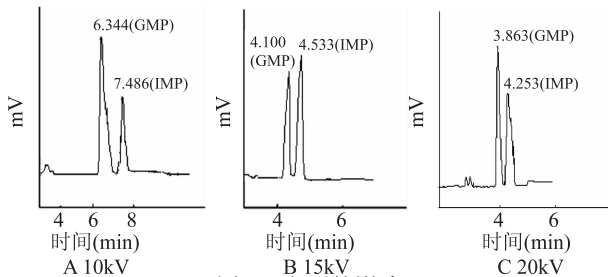


图4 电压的影响

注:运行缓冲液:5mmol · L⁻¹ NaH₂PO₄ -
5mmol · L⁻¹ H₃BO₃, pH = 10.3。

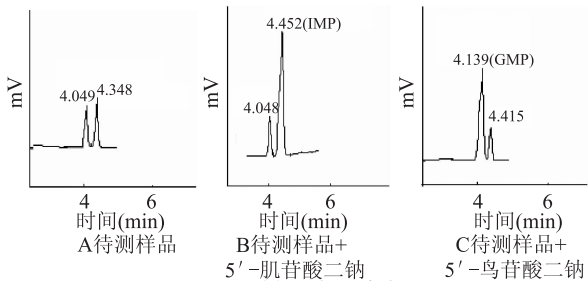


图5 样品峰的确定

注:运行缓冲液:5mmol · L⁻¹ NaH₂PO₄ -
5mmol · L⁻¹ H₃BO₃ -5% C₂H₅OH,
pH = 10.3,分离电压为 15kV。

二钠。

2.3 精密度实验

按照实验方法分别配制 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠标准溶液,按 1.2.4 测定 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的峰面积,9 次测定结果的相对标准偏差分别为 3.64% 和 4.60%。

2.4 定量分析

在电泳条件下,测定 5'-肌苷酸二钠、5'-鸟苷酸二钠系列标准溶液的峰面积,求出回归方程分别为: 5'-肌苷酸二钠: $A = -2.59 \times 10^4 + 1.74 \times 10^5 C$, $r^2 = 0.9978$; 5'-鸟苷酸二钠: $A = -2.65 \times 10^4 + 1.70 \times 10^5 C$, $r^2 = 0.9977$ 。

2.5 测定结果

按 1.2.2 方法对鸡精进行处理后,在电泳条件下测定其峰面积,代入回归方程计算其含量,结果见表 1。

表 1 定量分析结果(n=9)

样品	批号	GMP (mg · g ⁻¹)	IMP (mg · g ⁻¹)
鸡精 1	200811074B	4.59	5.07
鸡精 2	200903109B	4.70	5.73
鸡精 3	20081127C	2.99	11.0

2.6 回收率测定

对鸡精 1 (200811074B) 进行加标回收实验,结果见表 2。

表 2 回收率实验结果(n=9)

样品	成分	含量 (mg · g ⁻¹)	加标量 (mg)	测得量 (mg · g ⁻¹)	平均回 收率(%)
鸡精 1	5'-GMP	4.59	1.53	6.19	104
	5'-IMP	5.07	1.69	6.80	102

3 结论

在优化条件下,样品中的 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠在 5min 内可以得到较好的分离,且峰面积与浓度之间具有良好的线性关系。与液相色谱法、紫外分光光度法相比,本方法药品用量少,操作简单,适应于 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠的分离、检测。

参考文献

[1] 崔桂友.呈味核苷酸及其在食品调味品中的应用[J].中国调味品,2001(10):25-29.
[2] 黄亚光,黄水娣,王煥章,等.双波长分光光度法测定呈味核苷酸二钠混合物的含量[J].食品与发酵工业,2004,30(7):108-111.
[3] 杜建中,杨春梅,李自信,等.双波长比值光谱法测定 5'-鸟苷酸钠、5'-肌苷酸钠、5'-尿苷酸钠含量[J].食品科学,2008,29(1):225-227.
[4] 汪庆旗,陈青俊,丁献荣,等.高效液相法测定调味品中 5'-鸟苷酸二钠和 5'-肌苷酸二钠[J].中国酿造,2007(7):53-56.
[5] 陈青川,牟世芬,侯小平.离子色谱法测定增味剂中的 5'-肌苷酸二钠和 5'-鸟苷酸二钠[J].色谱,1999,17(3):290-292.
[6] 邓延倬,何金兰.高效毛细管电泳[M].北京科学出版社,1997.

(上接第 334 页)

轻自由基及代谢产物对组织的伤害作用,提示鸡油菌对防治糖尿病并发症方面也可以起到重要作用。

参考文献

[1] 邹方伦,姜山.贵州鸡油菌的应用与生物特性的研究[J].贵州科学,2001,19(1):42-47.
[2] 车振鹏.“三菌”复合保健口服液的功效研究(一)[J].食品科技,2002(2):69-70.
[3] 王茂胜,连宾,梁宗琦,等.鸡油菌多糖的提取及组成分析[J].重庆大学学报,2005,28(7):118-121.
[4] 宗灿华,于国萍.黑木耳多糖对糖尿病小鼠降血糖作用[J].食用菌,2007(4):60-61.
[5] Malay Pramanik,Indranil Chakraborty.Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.1) of an edible mushroom, Pleurotus

sajor-caju[J].Carbohydrate Research,2007,342:2670-2675.
[6] 陶明煊,王峰,刘俊,等.金顶侧耳多糖降血糖作用研究[J].食品科学,2009,30(15):227-230.
[7] 黄志江,季晖,李萍,等.人工虫草多糖降血糖作用及其机制研究[J].中国药科大学学报,2002(1):51-54.
[8] 杜梅,张松.食用菌多糖降血糖机理研究[J].微生物学杂志,2007(2):83-87.
[9] 李成军,张亚珍,孟文芳.当归多糖对 2 型糖尿病大鼠的降糖机制[J].齐齐哈尔医学院学报,2007,28(12):1422-1424.
[10] 刘成梅,付桂明,涂宗财,等.百合多糖降血糖功能研究[J].食品科学,2002,23(6):113-114.
[11] 刘娟,韩晓强,姜博,等.玉米须多糖治疗糖尿病作用机制的研究[J].中药新药与临床药理,2006,17(4):242-244.